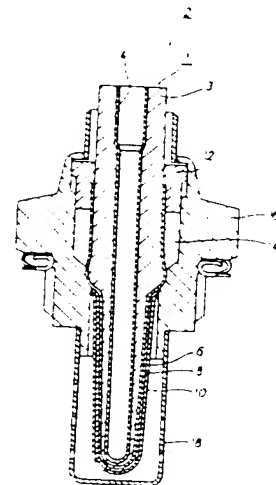


## 54) OXYGEN DETECTING ELEMENT

(11) 1-97855 (A) (43) 17.4.1989 (19) JP  
 (21) Appl. No. 62-311278 (22) 9.12.1987 (33) JP (41) 87p.193106 (32) 31.7.1987  
 (71) NGK SPARK PLUG CO. LTD. (72) TAKAO KOJIMA (2)  
 (51) Int. Cl. G01N27.58

**PURPOSE:** To improve response, by forming at least a part of a coating layer with the nonstoichiometric compound of transition metal oxide, and supporting a catalyst, by which the component comprising said compound balances the gas component of detected gas.

**CONSTITUTION:** A solid electrolyte body 3 of an oxygen detecting element 1 is formed with stabilized zirconia having oxygen ion conductivity as a raw material in a test tube shape. On the surface of an electrode 5 on the side of detected gas, a first coating layer 8 comprising spinel ( $Al_2O_3$ ,  $MgO$ ) is formed. A second coating layer 10 comprising titania, which supports a Pt catalyst, is formed on the surface thereof. Since a part of the coating layer comprises the nonstoichiometric compound of transition metal compound and the catalyst, by which the gas component of the detected gas is balanced, is supported, balancing of oxidation reaction of the gas component is accelerated, the oxidation reaction is ensured and response is improved.



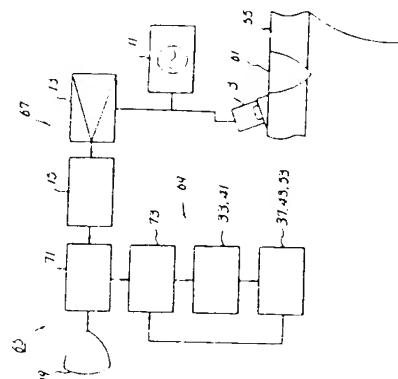
electrode  
electrode  
insulator

## 54) ULTRASONIC WAVE FLAW DETECTING APPARATUS

(11) 1-97856 (A) (43) 17.4.1989 (19) JP  
 (21) Appl. No. 62-253743 (22) 9.10.1987  
 (71) TOSHIBA CORP. (72) KEIICHI SASAKI  
 (51) Int. Cl. G01N29.04

**PURPOSE:** To move a scanning device along a welding line automatically all the time, by detecting the eccentricity between the welding line of a welding part and the scanning line of the scanning device through an image processor, and controlling a driving source for the scanning device.

**CONSTITUTION:** The eccentricity between the scanning line of an ultrasonic wave probe 3, which is moved with a scanning device, and the welding line of a welding part 61 is detected with an image processor 71. Motors 33 and 41 for moving the scanning device in a driving source are controlled by feedback through a control circuit 73 in correspondence with the amount of the detected eccentricity. The scanning line is made to agree with the welding line. The scanning device can be moved along the welding line automatically all the time. Thus the welding reliability can be improved.



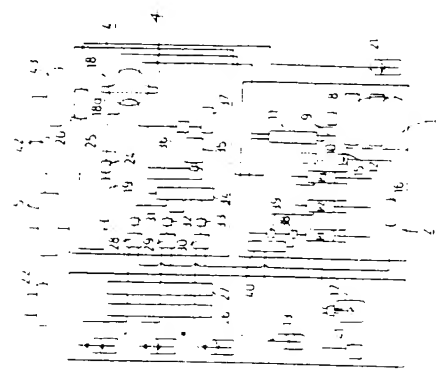
1: signal or data, 14: display device, 17, 18: position detector, encoder

## 54) AUTOMATIC MEASURING METHOD OF GLYCOSYLATED HEMOGLOBIN AND SAMPLE INTRODUCING VALVE

(11) 1-97857 (A) (43) 17.4.1989 (19) JP  
 (21) Appl. No. 63-175389 (22) 14.7.1988 (33) JP (31) 87p.175713 (32) 14.7.1987  
 (71) KYOTO DAICHI KAGAKU K.K. (72) MICHIO NAKA  
 (51) Int. Cl. G01N30.88, G01N33.49, G01N33.72

**PURPOSE:** To make it possible to perform quick, highly accurate analysis, by mixing a sample, which is sucked through a sampling nozzle into laky blood including unstable type glycosylated hemoglobin ( $HbA_{1c}$ ), removing reagent, and injecting the mixture into a column after a specified time.

**CONSTITUTION:** A sample sucking pump P2 in a sampling part 2 is driven. A specified amount of a sample is sucked through a nozzle 9 from a sample container in a bottle unit part 3. By the same way, laky blood including  $HbA_{1c}$  removing reagent is sucked through a nozzle 10. The reagent and the laky blood are injecting into a separately injecting diluting cell 12. Thus a sample 15 is formed. The sample 15 is sent into an analyzing part 4. After a specified time, the  $HbA_{1c}$  is removed. Then, the sample is supplied into a column for high speed chromatography. Other glycosylated hemoglobin other than  $HbA_{1c}$  is automatically analyzed quickly and highly accurately.



sample sucking pump, 2: sample sucking pump, 3: sample container, 4: analyzing part, 5: column, 6: reagent, 7: diluting cell, 8: nozzle, 9: nozzle, 10: nozzle, 11: nozzle, 12: diluting cell, 13: nozzle, 14: nozzle, 15: sample, 16: nozzle, 17: nozzle, 18: nozzle, 19: nozzle, 20: nozzle, 21: nozzle, 22: nozzle, 23: nozzle, 24: nozzle, 25: nozzle, 26: nozzle, 27: nozzle, 28: nozzle, 29: nozzle, 30: nozzle, 31: nozzle, 32: nozzle, 33: nozzle, 34: nozzle, 35: nozzle, 36: nozzle, 37: nozzle, 38: nozzle, 39: nozzle, 40: nozzle, 41: nozzle, 42: nozzle, 43: nozzle, 44: nozzle, 45: nozzle, 46: nozzle, 47: nozzle, 48: nozzle, 49: nozzle, 50: nozzle, 51: nozzle, 52: nozzle, 53: nozzle, 54: nozzle, 55: nozzle, 56: nozzle, 57: nozzle, 58: nozzle, 59: nozzle, 60: nozzle, 61: nozzle, 62: nozzle, 63: nozzle, 64: nozzle, 65: nozzle, 66: nozzle, 67: nozzle, 68: nozzle, 69: nozzle, 70: nozzle, 71: nozzle, 72: nozzle, 73: nozzle, 74: nozzle, 75: nozzle, 76: nozzle, 77: nozzle, 78: nozzle, 79: nozzle, 80: nozzle, 81: nozzle, 82: nozzle, 83: nozzle, 84: nozzle, 85: nozzle, 86: nozzle, 87: nozzle, 88: nozzle, 89: nozzle, 90: nozzle, 91: nozzle, 92: nozzle, 93: nozzle, 94: nozzle, 95: nozzle, 96: nozzle, 97: nozzle, 98: nozzle, 99: nozzle, 100: nozzle

⑩ 日本国特許庁(JP) ⑪ 特許出願公開  
⑫ 公開特許公報(A) 平1-97857

⑬ Int. Cl.<sup>4</sup> 識別記号 庁内整理番号 ⑭ 公開 平成1年(1989)4月17日  
G 01 N 30/88 E-7621-2G  
33/49 S-8305-2G  
33/72 A-8305-2G 審査請求 未請求 請求項の数 7 (全9頁)

⑮ 発明の名称 グリコヘモグロビンの自動測定方法及び試料導入バルブ

⑯ 特 願 昭63-175389

⑰ 出 願 昭63(1988)7月14日

優先権主張 ⑱ 昭62(1987)7月14日 ⑲ 日本(JP) ⑳ 特願 昭62-175713

㉑ 発 明 者 仲 道 男 京都府城陽市富野堀口78番地の6

㉒ 出 願 人 株式会社京都第一科学 京都府京都市南区東九条西明田町57番地

㉓ 代 理 人 弁理士 永田 久喜

明 細 書

1 発明の名称

グリコヘモグロビンの自動測定方法  
及び試料導入バルブ

2 特許請求の範囲

1. 高速クロマトグラフィーによりグリコヘモグロビンの分画を測定する場合において、試料容器に採取した多数の血液試料を全血或いは血球層のまま待機させ、試料容器を順次サンプリング部に送り込み、サンプリングノズルから吸引した血液試料を不安定型HbA<sub>1c</sub>除去試薬を含む溶血液と混合して希釈させ、該混合液の一部を試料導入バルブの試料ループに導き混合開始から一定時間後にカラムに注入して、不安定型HbA<sub>1c</sub>を除去或いは低減した状態で測定することを特徴とするグリコヘモグロビンの自動測定方法。
2. 待機させている試料容器以外に、割込み測

定ポートにセットした試料容器から血液試料をサンプリングするものである特許請求の範囲第1項記載のグリコヘモグロビンの自動測定方法。

3. 血液試料と溶血液との混合開始から一定時間経過後に混合液のカラムへの注入を行わせるために、次の注入タイミングから逆算して混合開始が間に合わない場合には、混合や注入を行わずに空の測定動作を行わせるものである特許請求の範囲第1項記載のグリコヘモグロビンの自動測定方法。
4. 反応を促進させるために、試薬添加後カラム注入までの間に温度コントロールを行なうものである特許請求の範囲第1項、第2項又は第3項記載のグリコヘモグロビンの自動測定方法。
5. 温度コントロールは、試料導入バルブの試料ループ部で行なうものである特許請求の範囲第4項記載のグリコヘモグロビンの自動測定方法。

6. 不安定型HbA<sub>1c</sub>除去試薬を含む溶血液を、試料ループを含む各流路やサンプリングノズル部を洗浄する洗浄液として使用するものである特許請求の範囲第1項記載のグリコヘモグロビンの自動測定方法。

7. 試料ループ部をループ加熱器で囲い、且つ全体を保温カバーで覆ったことを特徴とする試料導入バルブ。

### 3 発明の詳細な説明

#### 〔産業上の利用分野〕

本発明は、高速液体クロマトグラフィを原理とするグリコヘモグロビンの改良された自動測定方法、及び高速液体クロマトグラフィ装置に用いる改良された試料導入バルブに関する。

#### 〔従来の技術〕

ヘモグロビンに糖が結合したグリコヘモグロビン(HbA<sub>1c</sub>)は糖尿病患者に多く見られ、殊にHbA<sub>1c</sub>は人間ドック等の健康スクリーニング

とが可逆的にShift塩基結合したもので、血糖濃度に依存して比較的短時間の内に生成分解する。従って、糖尿病患者が健康人よりも多く、全HbA<sub>1c</sub>に対し10~20%にも及ぶことがある。また、空腹時よりも食後の方が多くなり、採血時の状態に大きく影響される。

一方安定型HbA<sub>1c</sub>は、不安定型HbA<sub>1c</sub>から緩徐に持続的に且つ不可逆的に生成され、過去の長期にわたる血糖レベルをよく反映する。従って、安定型のみを分離して測定することが望ましい。しかし、両者は構造的に究めて類似しており、液体クロマトグラフィでの分離はかなり困難である。

これに対処する一つの方法として、長さの長い高分解能カラムを用いて、分離性能を向上させることが行われている。この方法は化学処理によるグリコヘモグロビンの変性を来たしにくい利点はあるが、良好に分離させるには1検体に十数分以上もの分析時間を必要とする。そのため、測定検体数の増加や緊急時の測定に十分対応できない欠

や糖尿病の長期コントロールの指標として重要な測定項目となってきている。これは、HbA<sub>1c</sub>がグリコヘモグロビン(HbA<sub>1</sub>)中最も多く存在し、糖尿病での増加も他の成分に比べて著しく多い上に、HbA<sub>1c</sub>の値が、過去1~3カ月間の平均空腹時血糖値と良い相関関係を示すことによる。

ところで、グリコヘモグロビンにはHbA<sub>1c</sub>の他にHbA<sub>1a</sub>、HbA<sub>1b</sub>等があり、これらは比色法、電気泳動法、ミニカラム法、高速液体クロマトグラフィなどにより分離測定される。この内臨床検査の分野では、所要時間や分離性能の点から最近では高速液体クロマトグラフィ(HPLC法)が常用されている。

ただ、過去の血糖値と良い相関を示すのはHbA<sub>1c</sub>の内安定型と言われるもので、他に割合は少ないが不安定型のものがある。その割合は、健康人で空腹時全HbA<sub>1c</sub>中10~15%程度と言われている。この不安定型HbA<sub>1c</sub>は、ヘモグロビンのβ鎖N末端とグルコースの還元性末端

点があった。更に、このタイプのものはカラムが長いために装置が大型化するし高価になる。

一方、安定型HbA<sub>1c</sub>を分離測定するもう一つの方法として、前処理で不安定型HbA<sub>1c</sub>を化学的に分解除去する方法がある。これは、不安定型HbA<sub>1c</sub>がグルコースと一時的に結合(Shift塩基結合)しているため分解しやすいことに着目したものである。例えば、洗浄赤血球を等張リン酸緩衝液(37℃, 4時間)や生理食塩水(室温, 14時間)でインキュベートして不安定型HbA<sub>1c</sub>からグルコースを分離させる方法がある。

或いは、全血に溶血試薬を加えて35℃で十数時間インキュベートする方法もある。これは、試料を溶血させ希釈することで不安定型HbA<sub>1c</sub>の濃度を減少させるもので、特にpH6以下の酸性領域で効果が大きく反応も早いし、温度を上げると効果が大きい。更に、従来ミニカラム法に使用されている水う酸を含む市販の不安定型HbA<sub>1c</sub>除去試薬を加えるとより効果がある。

しかし、これらの前処理は時間がかかるとともに、不安定型HbA<sub>1c</sub>の分解に伴って他のグリコヘモグロビンや純ヘモグロビン(HbA<sub>0</sub>)の分解や変性も同時に進行する。

また溶血するタイプでは、溶血後の経過時間や測定までの経過温度によって安定型HbA<sub>1c</sub>の量も変動してしまう欠点があった。特に、多数の検体を自動測定する場合に血液試料を分解試薬を含む溶血液で希釈しておく、待機中の検体のうち、後で測定する検体の経過時間が長くなり、分解反応が過剰に進行して検体の変性してしまう欠点があった。

#### 〔発明が解決しようとする課題〕

本発明は、高速液体クロマトグラフィにより不安定型HbA<sub>1c</sub>除去試薬(分解試薬)を用いて迅速なグリコヘモグロビンの分析を行なうとともに、不安定型HbA<sub>1c</sub>以外のグリコヘモグロビンの分解や変性を抑え、高精度で再現性良く安定型HbA<sub>1c</sub>の測定を行なう方法を提供するこ

更に、混合液(検体)をカラムに注入するまでに加温することにより反応を促進し、より迅速な測定をなすことができる。この加温を、試料導入バルブの試料ループ部分で行なうと、他に加温ゾーンを設けたり余分な検体を加温する必要もなく、省スペース化や省エネルギー化が図れる。

またマニュアルで試薬を混合する手間を省き、マニュアル混合による誤差や、混合後測定までの試料の変性を防ぐことにより達成される。

次に、本発明方法の手順や測定装置の構成を説明する。

まず、各患者や被検者から採取された血液試料は、採血管やサンプリングカップ等の試料容器に入れられ、全血或いは血球層のまま試料保持部に待機させておく。全血或いはそれを遠心分離した血球層を使用するので前処理が不要で簡便である。尚、血球層を使用するのは、血漿を他の検査に使用した残りを有効に利用する場合も想定してのことであるが、全血でも長時間待機させておくことと底の方に血球成分が沈降する。これらに対処するた

とを目的とする。また本発明は、装置の構造が比較的シンプルで試料の取り換えや準備に手が掛からないグリコヘモグロビン分析方法を提供することを目的とする。

更に本発明は、高速液体クロマトグラフ装置において試料(血液試料に限らない)と反応試薬の混合液の温度をコントロールするのに最適な試料導入バルブを提供することを目的とする。

#### 〔課題を解決するための手段〕

上記目的は、多数の血液試料を全血或いは血球層のまま待機させておき、測定の順番がきた時点でサンプリングして速やかに不安定型HbA<sub>1c</sub>除去試薬を含む溶血液で希釈して混合し、混合開始から一定の定められた時間経過後に、高速液体クロマトグラフ装置のカラムに注入することにより達成される。尚、以下「試料」とは試料容器に採取した全血試料(或いは血球層)を言い、「検体」とはこの試料を溶血液で希釈した混合液を言う。

めに、サンプリングは試料容器の底に近い部分から行なうとよい。尚、サンプリングされた血液試料中の赤血球の割合にバラツキがあっても、HbA<sub>0</sub>や他のHbA<sub>1</sub>に対するHbA<sub>1c</sub>の割合は各試料毎に一定故、問題はない。血液試料には、通常抗凝固剤を加える。抗凝固剤としては、ヘパリン、EDTA-2Na等通常市販のものが使用できる。

各試料容器は、ラックやスネークチェン、ターnteーブル等の保持手段に多数保持され、順次サンプリング位置に送り込まれる。

サンプリング部では、ポンプの吸引作用でサンプリングノズルから所定量(1乃至数μl程度)の試料が吸引され、別途供給される不安定型HbA<sub>1c</sub>除去試薬を含んだ溶血液により希釈され、混合される。希釈倍率は、数十～数百倍、特に100～400倍程度である。

サンプリングや希釈の手順は、各種ポンプの構造や組合せ等により種々な構成や変形例が考えられるが、要は測定直前の数十秒～数分以内にサン

ブリングした血液試料を除去試薬を含む溶血・洗浄液で希釈し、混合開始後一定の時間経過後に試料導入バルブを介してカラム内に注入できる構成のものであればよい。これらの動作は自動的に且つ連続して行えるものであること、汚染防止の工夫がなされていることが必要である。

不安定型HbA<sub>1c</sub>除去試薬としては、ホウ酸やリン酸化合物、或いはこれらを含む市販の試薬等が用いられる。pHは酸性のものがよい。溶血剤は、一般市販のものが用いられる。

カラムとしては、例えば球状イオン交換ゲル（陽イオン、陰イオン）を充填したような高速液体クロマトグラフィ用のものが用いられ、この分離能により検体の処理時間が規制される。

溶血後の反応の進み具合は当然に不安定型HbA<sub>1c</sub>除去試薬の性能に左右されるが、また反応開始後の経過時間と経過温度の関数ともなる。測定に要する時間は、サンプリングや希釈混合、送液、洗浄等の操作をする時間と加温時間の和であり、多数の試料を処理するには測定時間が短い方

がよい。従って、試薬の不安定型HbA<sub>1c</sub>分解能力が低ければ、不都合例えば試料の変質を来さない範囲で検体（混合液）の送液を加温することにより反応時間の短縮が図れる。この場合、分析時間や試薬の分解能力を勘案して、測定までの時間が一定になるように、試料導入バルブ部分を含む送液の全体或いは一部を温度コントロールする。加温温度は、試薬の分解能力や加温時間を考慮して、30℃～65℃より好ましくは40～55℃程度とする。65℃以上では蛋白質の変性が起こり好ましくない。30℃以下だと、夏期では冷却の必要性が生じることもある。

次に、洗浄液について説明する。洗浄液は、前回の検体を測定した後汚染を防止するためにサンプリングノズルや各流路を洗浄するものである。しかし、本発明ではサンプリングした試料を溶血液で希釈混合する構成を採っているため、本来洗浄液と溶血液の2系統の送液系が必要となる。勿論この構成でもかまわないが、両者を併用し溶血・洗浄液として用いると、送液ポンプが1個少なく

てすむし、配管や送液シーケンスが簡単になる利点がある。

また本発明では、血液試料と溶血液との混合開始から一定時間経過後に混合液（検体）のカラムへの注入を行わせる構成をとっている。従って、何らかの理由、例えばラックの移動がスムーズにできなかったとか、割込み測定をするタイミングが合わなかった等により、次回の注入タイミングから逆算して混合開始が間に合わない場合には、その回の混合や注入を行わずに空の測定動作を行わせることが望ましい。この混合タイミングのずれは、1種類の溶離液を用いる場合には問題にならない。しかし、濃度やpHが異なる2種以上の溶離液を用いる場合には、注入タイミングが狂うとカラム内のバランスを崩すことによる。

#### 〔実施例〕

次に、本発明方法を具現化したグリコヘモグロビン測定装置の一例を示して、本発明方法を詳細に説明する。尚、本例では、溶血液と洗浄液を共

通に使用し、試料導入バルブの試料ループで検体を加温している。

第1図は、本発明方法を実施化したグリコヘモグロビン自動測定装置の一例を示すフローダイアグラム、第2図は同じくサンプリング部のフローダイアグラム、第3図は試料導入バルブの概略斜視図である。

この装置は、全血試料或いは血球層を入れた複数の試料容器を保持しプールしておく試料保持部1と、試料のサンプリングや溶血液との希釈混合を行なうサンプリング部2、溶離液や溶血・洗浄液、廃液の各容器を収納するボトルユニット部3、試料導入バルブやカラム、測光手段等を含む分析部4の他、プログラムや入力した指令に基づき装置全体の作動を制御し、測定値の記憶や演算を行い、その結果を患者番号や測定日時等とともにプリンター等の表示装置に出力する記憶・制御部、作動指令の入力等を行なう操作キーボード等から構成される。記憶・制御部は、例えばマイクロコンピュータ5が用いられ、また表示装置には他に

デジタル表示器が用いられる。

次に、各部の構成や動作を説明する。まず試料保持部1は、複数の試料容器6を保持したラック7を多数組載置するようになっており、各ラック7は試料容器6を順次サンプリング位置に置くように矢印方向に駆動される。また緊急測定のための割込測定ポート8を設けてもよい。

サンプリング部2には、2つのノズル9、10を備えたサンプリングノズル機構11と、溶血・洗浄液ポンプ(P<sub>1</sub>)、試料吸引ポンプ(P<sub>2</sub>)、検体導入ポンプ(P<sub>3</sub>)及び希釈分注槽12が設けられている。試料吸引ポンプ(P<sub>2</sub>)の容量は1〜数μl、洗浄液ポンプ(P<sub>1</sub>)と検体導入ポンプ(P<sub>3</sub>)の容量は数百μlである。サンプリングノズル機構11は、回転とともに上下動する。尚、溶血・洗浄液13は前記した不安定型HbA<sub>1c</sub>分解試薬や溶血剤を試料の希釈液に溶解したもので、本例ではこの液を各ポンプやノズルその他の流路の洗浄用と併用している。また、本発明で試料14とは試料容器6に採取した全血試料或いは

血球膜を言い、検体15とはこの試料14を溶血・洗浄液13で数十〜数百倍に希釈したものを云う。

サンプリング部2では、まず試料吸引ポンプ(P<sub>2</sub>)を駆動して所定量の試料14を第1のノズル9から吸引する。次に、希釈分注槽12上にサンプリングノズル機構11を移動して第2のノズル10から溶血・洗浄液13を吐出させ、第1のノズル9の外壁を洗浄する。この目的のために、第2のノズル10の先端を第1のノズル9の方に曲げてある。廃液は、廃液バルブ16を通過してボトルユニット部3のドレインボトル17に導かれる。次いで、ポンプ(P<sub>1</sub>)・(P<sub>2</sub>)を駆動して、希釈分注槽12にサンプリングした試料14と所定量の溶血・洗浄液13を吐出する。この吐出で両者13・14は攪拌される。更に、第1のノズル9で吸入・吐出を繰り返して十分に攪拌混合するようにしてもよい。この混合された検体15を、検体導入ポンプ(P<sub>3</sub>)の吸入作用によって第1のノズル9から吸引し分析部4の試料導入

バルブ18に送り込む(第1図、第2図の状態)。

その後、希釈分注槽12、配管、第1のノズル9外壁等を溶血・洗浄液13で洗浄し、廃液を廃棄して次の試料吸引に備える。

一方、試料導入バルブ18の試料ループ18aに送り込まれた検体15は、該試料ループ18a内に保持され、加温される。試料ループ18aは、第3図に示すようにループ加温器18bで囲まれ、さらに保温カバー18cで該ループ加温器18bと試料導入バルブ18の主要部を覆う。図中、符号18dは検体用出入管、18eは溶離液用出入管、18fはモータ、18gはギヤボックス、18hは保温用のブロックである。保温カバー18cは、このブロック18hにねじ止めされる。

この方式による加温は、試料ループ18a内にある検体のみが確実に加温されるのでエネルギーが無駄がないし、加温しない部分即ち不安定型HbA<sub>1c</sub>が十分に分離除去されていない検体がカラム19に注入される危険性もない。

次いで試料導入バルブ18のモータ18fが回

転して第4図の如き状態となり、試料ループ18a内の検体15はボトルユニット部3から送られてくる溶離液により押し出されて、カラム19に注入される。検体15の各成分即ちHbA<sub>1a</sub>、HbA<sub>1b</sub>、HbA<sub>1c</sub>、HbA<sub>2</sub>等は、カラム19内で分離され、順次光度計20で測光されてドレイン容器21に廃棄される。測光結果はマイクロコンピュータ5に送られ、各分画パターンとピークの溶出時間、各成分の含有%等が演算されプリンター22で精出される。尚、カラム19の駒には夾雑物を除去するフィルター24を配置し、全体を恒温槽25内に収納しておくこと安定した測定が行える。

以上の操作を、第2図に基づきポンプ(P<sub>1</sub>)・(P<sub>2</sub>)・(P<sub>3</sub>)の作動及び溶血・洗浄液13用の流路切り換えバルブ38・39の流路状態についてまとめると、表-1のようになる。尚、各ポンプの1は吸引、1は排出、無記入は停止を示す。

表-1

ポンプ・バルブ ステップ	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>	38	39	操 作
1	↓	↓		┐	┐	試料吸引、溶血・洗浄液吸引
2	↓			┐	┐	溶血・洗浄液を排出してノズル外部を洗浄
3	↓			┐	┐	溶血・洗浄液吸引
4	↓	↓		┐	┐	血液試料と溶血・洗浄液を排出して混合
5			↓	┐	┐	検体を吸引して、その一部を試料ループに導入し加温する
6			↓	┐	┐	試料導入バルブを切換えて検体をカラムに注入、余分な検体排出
7	↓			┐	┐	溶血・洗浄液吸引
8	↓			┐	┐	試料ループその他流路を洗浄

通ってドレイン容器21に到る。図中符号38は圧力検出器、37はゲンバである。

尚、第1図及び第2図中、符号38・39は溶血・洗浄液13用の流路切り換えバルブ、40は同じく溶血・洗浄液13用の液切れセンサー、41はドレインボット17用の吸引エアポンプ、42は表示器、43は操作キーボードである。

以上の説明は連続的に並べられた試料を測定する場合であり、この場合常に一定のシーケンスで作動させれば希釈から注入までの時間は一定になる。しかし、採血の時間的バラツキ等で試料容器がラック7等に不連続に置かれている場合等では、次の試料を捜すために余分な不規則の時間が必要である。緊急測定のために割込みポートに試料容器をセットした場合にも、血液試料の吸引タイミングがずれることがある。そこで、検体15のカラム18への注入が終わった時点で次の試料を捜しておき、次の注入の時間から逆算して必要なタイミングで希釈を開始させるようにするとよい。

希釈開始について、既に次の注入に関に合わ

前記操作において、試料14のサンプリング量を1.5  $\mu$ l、これを希釈する溶血・洗浄液13の量を450  $\mu$ lとすると希釈倍率は300倍となる。また検体15の加温時間や温度は、不安定型Hb A<sub>1c</sub>除去試薬の分解能力によるが、本出願人が「21H」なる名称で販売している、リン酸化合物系の不安定型Hb A<sub>1c</sub>除去試薬を含む溶血液を使用した場合、上記希釈倍率のもので、48℃だと2分40秒が最適な条件である。尚、60℃では2分、40℃では3分、33℃では4分で不安定型Hb A<sub>1c</sub>の分解がほぼ完全に行なわれる。

ところで、本例では3種類の溶離液を用いている。各溶離液(A)・(B)・(C)は、送液シーケンスに基づき加熱コイル26、冷却コイル27、脱泡装置28・29・30を通り、夫々切り換えバルブ31・32・33によって順次マニホールド34に送り込まれる。マニホールド34で一つの流路となった各溶離液は、送液ポンプ35で試料導入バルブ18に圧送され、続いてカラム19に注入され、検体15を搬送しつつ光度計20を

ないことが判明しておれば、その際は混合やカラムへの検体の注入を取りやめ、一回の測定分の送液ケーシングを続けることで、濃度やpHの異なる3種類の溶離液を用いる場合でもカラムの平衡条件を崩すことなく安定した測定を執行させることができる。

〔従来法との比較〕

(等張リン酸緩衝液による血球洗浄法との比較)

表-2

分画 条件	測定値 (%)			
	A <sub>1a</sub> + A <sub>1b</sub>	F	L-A <sub>1c</sub> + S-A <sub>1c</sub>	A <sub>1</sub>
21L	1.5	0.2	5.9	7.4
21H	1.4	0.2	5.2	6.6
"S" + 21L	1.4	0.2	5.2	6.6
"S" + 21H	1.4	0.2	5.2	6.6

表-2中 FはグリコヘモグロビンHbF、L-A<sub>1c</sub>は不安定型HbA<sub>1c</sub>、S-A<sub>1c</sub>は等張リン酸緩衝液による血球洗浄法を示す。

その結果、従来法による不安定型HbA<sub>1c</sub>分画の除去と同等の効果が得られた。血球洗浄法と21Hを併用したものを比較対象としたが、これ以上の不安定型HbA<sub>1c</sub>分画の低下や、変性によるA<sub>1a</sub>+b成分の増加も認められなかった。

尚、前処理もせず、不安定型HbA<sub>1c</sub>除去試薬も用いない場合(21L)、全ての値が高い。L-A<sub>1c</sub>+S-A<sub>1c</sub>に於ける21Lと他の処理の差が不安定型HbA<sub>1c</sub>と推察できる。本例では、不安定型HbA<sub>1c</sub>は、ヘモグロビン全体の約0.7%である。

測定は以下の条件によった。

- ・21L: 不安定型HbA<sub>1c</sub>除去試薬を含まない溶血・洗浄液。  
ノニオン系界面活性剤1g/g  
リン酸2水素カリ0.1g/g  
リン酸1水素カリ0.3g/g  
pH7.5
- ・21H: 不安定型HbA<sub>1c</sub>除去試薬を含む溶血・洗浄液

- ・測定条件: 何れも、実施例の方法による。加温温度48℃、加温時間2分40秒、測定時間4分。n=5。

本発明方法は、以上詳述したように高速液体クロマトグラフィを原理とするグリコヘモグロビンの自動測定方法の改良に係り、各患者から採取した多数の血液試料を全血或いは血球層のまま試料保持部に待機させておき、測定の直前(数十秒~数分前)にサンプリングして不安定型HbA<sub>1c</sub>除去試薬を含む溶血・洗浄液により試液混合し、混合開始から一定時間経過後に高速液体クロマトグラフ装置のカラムに注入するようにしたものである。また、必要に応じて希釈後カラムに注入するまでに加温するものである。

従って、①高性能の長いカラムを用いる従来方法に比べて大幅に迅速な測定が行えらるとともに、それと同等程度の精度を得ることができる。②マニュアルで試薬を混合する手間を省き、手作業希釈による誤差のない正確な測定が可能になる。③

ノニオン系界面活性剤1g/g

リン酸化合物 0.1g/g

KOH 0.3g/g

pH6

- ・"S"+21L: 血球洗浄法(37℃)で6時間インキュベートしたもの。Sは、Salineを示す。

等張リン酸緩衝液(14容)に洗浄赤血球(1容)を加え、連続回転混和しながら37℃で6時間インキュベーションすることにより不安定型HbA<sub>1c</sub>を除去する。

その後、血球層を分取し、21Lで300倍に希釈して測定。

- ・"S"+21H: Salineに21Hを負荷した。

S+21Lと同様に等張リン酸緩衝液で処理した血球層を分取し、21Hで300倍に希釈して測定。

- ・検体: 健常人。採血直後に実験。

全血或いはそれを遠心分離した血球層を使用するので前処理が不要である。④予め溶血試薬で希釈しておかないので、測定までの試料の変性がなく、不安定型HbA<sub>1c</sub>以外のグリコヘモグロビンの分解や変性を押さえて安定型HbA<sub>1c</sub>の正確な測定ができる。⑤測定値が不安定型HbA<sub>1c</sub>の影響を受けないので、採血の時間的制約がなく、患者に負担をかけない。⑥更に、測定直前に試料を溶血し、常に一定のタイミングでカラムに注入されるので、安定した分析が可能となる。特に、試料が不連続でセットされた場合でも、カラムの平衡化条件を崩すことがないので、クロマトパターンが安定する。等多くの優れた効果を有するものである。

一方、本発明の試料導入バルブは、試料液と反応試薬を一定時間所定温度に加温するものである。そして、試料ループ内にある検体のみを確実に加温できるのでエネルギーに無駄がないし、加温しない部分がカラムに注入される危険性もなく、正確に制御できる。また、従来の試料導入バルブに



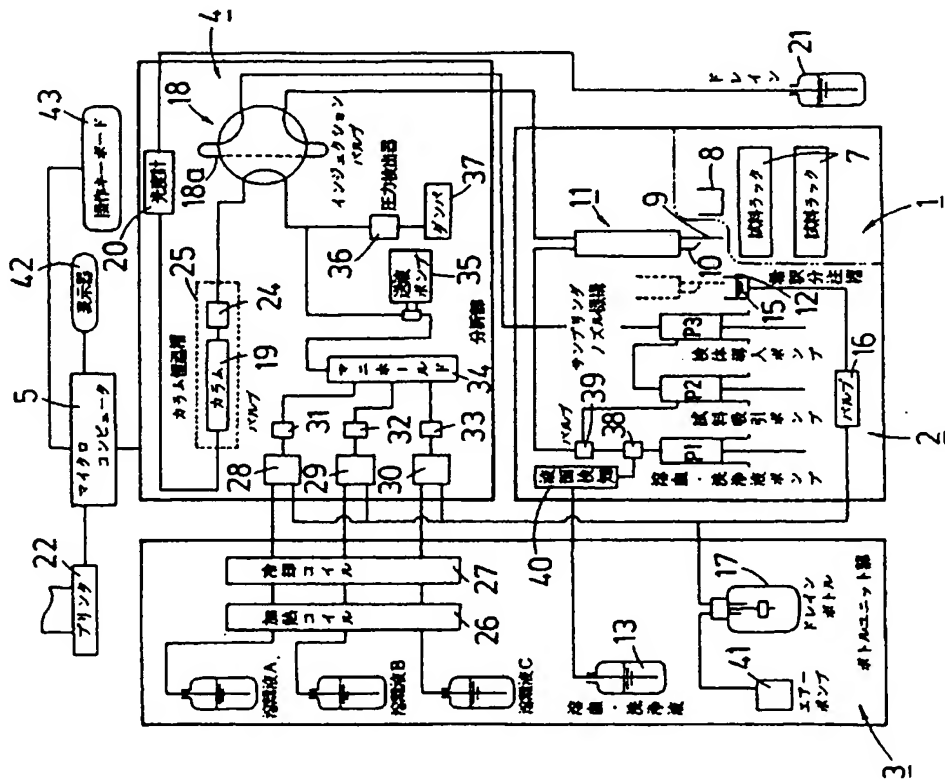
簡単な改良を施すだけで簡単に得られるし、他に  
加温装置を設けなくてもよいので、余分なスペース  
が入らない等の利点がある。

#### 4 図面の簡単な説明

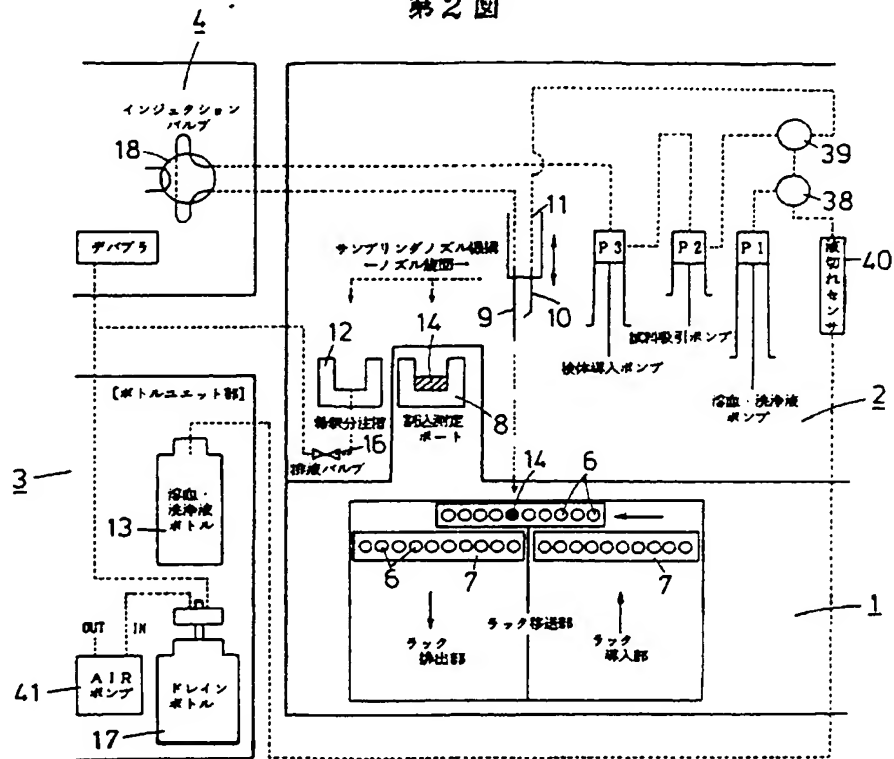
第1図は、本発明方法を実施化したグリコヘモ  
グロビン自動測定装置の一例を示すフローダイヤ  
グラム、第2図は同じくサンプリン部のフローダ  
イヤグラム、第3図は試料導入バルブの概略斜視  
図、第4図はカラムへの検体注入時の試料導入バ  
ルブの状態を示す平面図である。

- |                |                           |
|----------------|---------------------------|
| 1…試料保持部        | 14…試料                     |
| 2…サンプリング部      | 15…検体                     |
| 4…分析部          | 18…試料導入バルブ                |
| 6…試料容器         | 19…カラム                    |
| 9・10…ノズル       | P <sub>1</sub> …溶血・洗浄液ポンプ |
| 11…サンプリングノズル機構 | P <sub>2</sub> …試料吸引ポンプ   |
| 12…希釈分注槽       | P <sub>3</sub> …検体導入ポンプ   |
| 13…溶血・洗浄液      |                           |

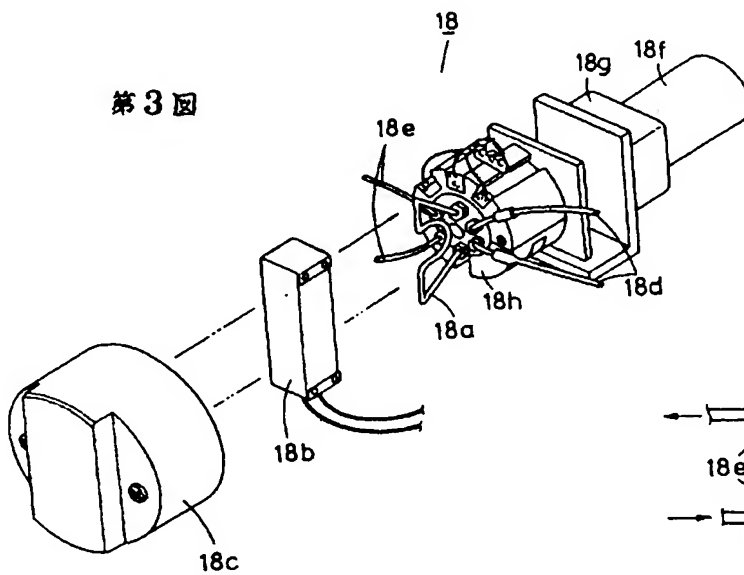
第1図



第2図



第3図



第4図

